

平成30年6月25日現在

機関番号：32610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14576

研究課題名(和文)キイロショウジョウバエにおける未受精卵からの単為発生作出

研究課題名(英文)Genetic basis of the initiation of sexual and parthenogenetic development in *Drosophila*

研究代表者

平井 和之 (HIRAI, Kazuyuki)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：70597335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：有性生殖と単為生殖を決定づける遺伝的機構の解明を目的に、下記の3点に取り組んだ。有性生殖のみを行うキイロショウジョウバエを用いて、未受精卵からの単為発生の誘導を試みた。アナナスショウジョウバエの有性生殖系統と自然集団由来の単為生殖系統を用いて比較ゲノム解析を行い、単為生殖の成立に重要な染色体領域を特定した。キイロショウジョウバエ新規遺伝子Elysの機能解析を行い、これが卵の核と精子の核を合体して接合子を作るために必須であることを示した。

研究成果の概要(英文)：The genetic changes that allow the transition from sexual reproduction to parthenogenesis in animals remain elusive. To address the problem we here performed the following experiments using *Drosophila melanogaster* and *D. ananassae*. Firstly, we tried to induce parthenogenetic development of *D. melanogaster* unfertilized eggs, with de novo formation of centrosomes in the egg cytoplasm. Secondly, our comparative genomic analysis of the sexual and parthenogenetic strains of *D. ananassae* identified two genomic regions on the second chromosome essential for parthenogenetic development to occur. Finally, we have shown that the maternal-effect gene Elys of *D. melanogaster* is required for zygote formation using the two nuclei from the ovum and sperm.

研究分野：遺伝学、細胞遺伝学

キーワード：単為発生 中心体 ゲノム 受精 接合子

1. 研究開始当初の背景

動物界における単為生殖は、有性生殖により繁殖している動物種が、その進化の過程で新たに獲得した生殖様式と考えられている。有性生殖から単為生殖への生殖様式の転換は生物種の繁殖に極めて大きな影響をもつと考えられるが、このような転換が、どのような細胞分裂機構の変化、またそれを引き起こす遺伝的変異をもとにして可能になるのか、未解明の問題として残されている。

2. 研究の目的

キイロシヨウジョウバエにおいて、未受精卵からの単為発生が強く抑制されている。有性生殖と単為生殖の両方を行うことのできるキイロシヨウジョウバエの作製により、このモデル生物の利用価値をこれまで以上に高めることができるが、その作製方法は確立されていない。本研究において、下記の3つの観点から、有性生殖と単為生殖、それぞれの生殖様式を成立させるために必須な遺伝的機構を解析した。

(1) 中心体は胚発生に必須である。キイロシヨウジョウバエの卵形成過程において、中心小体の複製に重要な DSas-4、DSas-6、Ana2 などのタンパク質を過剰発現することで、卵細胞質に中心体の新規合成を引き起こすことができることが知られている。これらを過剰発現させた未受精卵の細胞質には、膨大な数の中心体が新規に合成されるが、単為発生は認められてない。二極性の紡錘体が形成されるために、1つの核に対して2つの中心体が必要である。そこで本研究では、未受精卵の細胞質に中心体が新規合成されるものの、その数は低く抑えられた卵の作製を試みる。これにより、キイロシヨウジョウバエ有性生殖系統の未受精卵から、単為発生の誘導を試みる。

(2) 熱帯に分布するアナナスシヨウジョウバエも基本的に有性生殖によって繁殖する

が、特定の自然集団には単為生殖が可能な個体がいる。申請者は最近、アナナスシヨウジョウバエの未受精卵が単為発生を開始する細胞学的機構を明らかにした。単為生殖系統の未受精卵は、一倍体の雌性前核が核分裂を行い、それら2つの娘核から二倍体の核を形成する。このようなアナナスシヨウジョウバエの単為生殖は、遺伝的要因により引き起こされていることが既に分かっているため、その遺伝子を特定することを本研究の目的のひとつとした。

(3) また、キイロシヨウジョウバエにおいて、受精期および胚発生開始期の遺伝的制御機構については、この過程で異常を引き起こす突然変異がこれまでにあまり得られていないことから、理解が十分に進んでいない。本研究では、共同研究者によって新たに確立された、受精直後に発生が停止する、*Elys* と *Nup160* 遺伝子のアレルを持つ系統について、詳細な細胞学的解析を行った。いずれの遺伝子も、卵由来の一倍体核と精子由来の一倍体核から、接合子の二倍体核を形成するために重要なはたらきを持つことが分かった。

本研究は、動物の繁殖戦略の遺伝的基盤を解明するために重要である。

3. 研究の方法

(1) ユビキチンプロモーターを用いて、DSas-4、DSas-6、Ana2 タンパク質を比較的低い量、発現誘導できる系統を入手した (Stevens et al., JCB, 2010)。これにより、卵細胞質で比較的少量の中心体が新規合成されると考えられた。また、雄性発生の例を参考に (Komma and Endow, PNAS, 1995)、単為発生の誘発の可能性を高めるために、それらを α チューブリン遺伝子の突然変異と組合せた系統を作製した。

(2) アナナスシヨウジョウバエの単為生殖を可能にする遺伝子の特定を目的に、ゲノム解析を行った。以前の研究で、ゲノムの一部

に単為生殖系統の遺伝子を持ち、残りのほとんどの部分が有性生殖系統の遺伝子になっている単為生殖系統を多数作製した。それらを用い、単為生殖に必要な遺伝子のマッピングを分子マーカーを利用して行った。さらに、戻し交配により作製した単為生殖系統のゲノムを、長鎖リードを得ることのできるシーケンサーで解析した。

(3) キイロショウジョウバエの *Elys* 遺伝子座の2つの変異が、共同研究者によって作製され、系統として確立された。それらの表現型は雌不妊である。雌は正常な形態の卵を産生するが、それらの発生は進まず、次世代が得られない。この胚発生の異常について詳細に解析した。産卵直後の受精卵を集めて固定し、DNA、中心体、微小管を染色した。また、同様の表現型を示す、キイロショウジョウバエの遺伝的背景に、オナジショウジョウバエの *Nup160* 野生型遺伝子 (*Nup160^{im}*) をもつ系統についても解析し、表現型を *Elys* 変異の場合と比較した。

4. 研究成果

(1) ユビキチンプロモーターの制御により、DSas6、DSas4、Ana2 のそれぞれが過剰発現する雌を準備した。さらにそれらの組合せにより、DSas-4 と DSas-6、DSas4 と DSas6、Ana2 と DSas6 が過剰発現される雌を作製した。以前の報告によると、これらの雌が産む未受精卵のうち、10%より割合で中心体の新規合成が引き起こされている。各遺伝的背景を持つ雌が産んだ未受精卵をそれぞれ数百個得た。しかし、それらの一齢幼虫への発生はまったく認められなかった。また卵のDNAを染色したが、未受精卵が核分裂を行っている例はなかった。そのため、この方法による単為生殖の誘導は難しいと判断された。他の研究者も異なる方法で単為発生の誘発を試みているが、これまでに成功は見られていない (Pimenta-Marques et al., 2016, Science)。

(2) アナナスショウジョウバエにおいて、単為生殖を可能にする遺伝子が、少なくともゲノムの2領域にあることが分かった。これらの領域は、第2染色体左腕の約1 Mbpと同じ染色体の右腕の約1.4 Mbpである。この2つの領域が単為生殖系統由来のDNAのとき、それら系統は比較的安定して維持できた。しかし、その領域のDNAの片方だけが単為生殖系統由来で、もう一方が有性生殖系統由来の時、または両方ともに有性生殖系統由来のとき、それら系統の雌の産子数は非常に少なく、系統として維持することが難しかった。これら2領域に関する既存のゲノムの情報から、単為生殖に結びつく遺伝子は見つからない。現在利用できるアナナスショウジョウバエのゲノム情報はあまり充実したものではないため、今後、これら領域の塩基配列をもとにタンパク質ドメインの解析などを行い、単為生殖と関係のある遺伝子の候補を絞る必要がある。なお、PacBioシーケンサーによる解析から、当該領域には、逆位など、染色体レベルでの塩基配列の変化がないことを確認した。

(3) キイロショウジョウバエの *Elys* 突然変異は母性効果によって胚の致死を引き起こす。卵形成自体に異常は認められない。突然変異雌が産んだ受精卵は、胚発生初期で発生が停止していた。最も発生が進んでいるものでも、第1回目の有糸分裂の中期で、それを越える発生時期は認められなかった。細胞学的解析から、*Elys* 変異は第1回目の有糸分裂の紡錘体形成に異常をもたらすことが明らかになった。中心体が紡錘体の極から外れ、細胞質中にランダムに散らばっていた。ELYSタンパク質のはたらきが中心体に関与していることが示唆された。

正常な第1回目の有糸分裂の紡錘体は特徴的である。卵由来の核と精子由来の核の周りに独立した2つの紡錘体が形成され、それらが紡錘体極で結びつけられている。しかし、

Elys 変異では、2つの核が融合して一つの集まりを形成し、またその一つの核を取り囲むような一つの紡錘体ができていた。第1回目の有糸分裂の中期、このような状態で発生が停止した胚が多数観察された。しかし、これに続く後期の胚は全く観察されなかった。*Nup160^{im}*の表現型も、*Elys*と非常によく似ていた。したがって、*Elys*と*Nup160*が、受精卵第1回目の有糸分裂に特有な紡錘体形成に関与していることが分かった。また、それらの因子は共通して、分裂期の中心体の挙動に重要であることが明らかになった。本研究により、*Elys*と*Nup160*が有性生殖により2倍体の核を形成するために必須な遺伝子であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

- ① Kazuyuki Hirai, Zhuo Wang, Kohei Miura, Takaaki Hayashi, Takeshi Awasaki, Moe Wada, Yoko Keira, Hiroyuki O. Ishikawa and Kyoichi Sawamura, Genetic Analyses of *Elys* Mutations in *Drosophila* Show Maternal-Effect Lethality and Interactions with Nucleoporin Genes, *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 査読有、Early online 2018年5月
DOI: 10.1534/g3.118.200361

[学会発表] (計 7件)

- ① 澤村京一, 平井和之, Wang Zhuo, 栗崎健, 和田萌, 計良陽子, 石川裕之、核膜孔複合体タンパク質 ELYS の変異によるショウジョウバエの発生異常、第89回日本遺伝学会、2017年
- ② Kazuyuki Hirai, Haruka Suzuki, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Muneo

Matsuda, The initiation and progression of the earliest cycles in parthenogenetic *Drosophila ananassae*, THE 4TH ASIA-PACIFIC DROSOPHILA RESEARCH CONFERENCE、2017年

- ③ 平井和之, 水口洋平, 豊田敦, 松田宗男、アナナスショウジョウバエの単為発生における核分裂開始機構、2016年度国立遺伝学研究所研究会 ショウジョウバエの生殖システムと生殖戦略、2017年
- ④ Kazuyuki Hirai, Haruka Suzuki, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Muneo Matsuda, The progression of the first mitosis and diploidization in parthenogenetic embryos of *Drosophila ananassae*, 22nd International Congress of Zoology/第87回日本動物学会大会 合同大会、2016年
- ⑤ Kazuyuki Hirai, Haruka Suzuki, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Muneo Matsuda, The progression of the first mitosis and diploidization in parthenogenetic embryos of *Drosophila ananassae*, 第12回日本ショウジョウバエ研究会、2016年
- ⑥ 平井和之、鈴木遥、水口洋平、豊田敦、松田宗男、アナナスショウジョウバエ単為発生胚における核分裂開始と二倍体核形成機構、日本動物学会第86回新潟大会、2015年
- ⑦ Kazuyuki Hirai, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Muneo Matsuda, De novo formation of centrosome-like structures and their roles in the progression of the first mitosis and diploid nucleus formation in parthenogenetic embryos of *Drosophila ananassae*, EMBO Workshop Cell cycle、2015年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 和之 (HIRAI, Kazuyuki)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：70597335

(2) 研究分担者

該当なし。

(3) 連携研究者

該当なし。

(4) 研究協力者

該当なし。